

jp2000136199/pn

L1 ANSWER 1 OF 1 JAPIO (C) 2003 JPO on STN
ACCESSION NUMBER: 2000-136199 JAPIO
TITLE: SIGNAL PEPTIDE USABLE IN SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE,
SECRETION-TYPE EXPRESSION VECTOR, AND PRODUCTION OF
PROTEIN BY USING THE SAME
INVENTOR: HIGASHIDA HIDEKI; HAMA YUKO
PATENT ASSIGNEE(S): ASAHI GLASS CO LTD
PATENT INFORMATION:

PATENT NO	KIND	DATE	ERA	MAIN IPC

JP 2000136199	A	20000516	Heisei	C07K014-39

APPLICATION INFORMATION

STN FORMAT: JP 1998-308946 19981029
ORIGINAL: JP10308946 Heisei
PRIORITY APPLN. INFO.: JP 1998-308946 19981029
SOURCE: PATENT ABSTRACTS OF JAPAN (CD-ROM), Unexamined
Applications, Vol. 2000
INT. PATENT CLASSIF.:
MAIN: C07K014-39
SECONDARY: C12N001-19; C12N015-09; C12P021-02
INDEX: C12N001-19, C12R001:645; C12P021-02, C12R001:645
ABSTRACT:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a new peptide of a signal peptide derived from a fission yeast of Schizosaccharomyces pombe and capable of allowing the yeast to secrete and produce different kinds of proteins in good efficiency by transforming the yeast by using a new secretion type expression vector obtained by using a genetic sequence encoding the signal peptide.

SOLUTION: This new peptide is represented by an amino acid sequence of the formula. The peptide is obtained by carrying out a PCR by using cDNA library of Schizosaccharomyces pombe as template, and a primer designed based on the sequence preserved among invertase genes derived from other organisms, and selecting a positive alone from the genomic library of the Schizosaccharomyces pombe by using the product of the PCR as a probe. The signal sequence in the precursor of the invertase gene of the Schizosaccharomyces pombe is determined by selecting a fragment having a specific length from the positive alone determining the base sequence and detecting the presence or absence of the invertase activities.

COPYRIGHT: (C) 2000, JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-136199

(P2000-136199A)

(43) 公開日 平成12年5月16日 (2000. 5. 16)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード (参考)
C 0 7 K 14/39		C 0 7 K 14/39	4 B 0 2 4
C 1 2 N 1/19		C 1 2 N 1/19	4 B 0 6 4
15/09	Z N A	C 1 2 P 21/02	C 4 B 0 6 5
C 1 2 P 21/02		C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 H 0 4 5
// (C 1 2 N 1/19			

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 13 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-308946

(22) 出願日 平成10年10月29日 (1998. 10. 29)

(71) 出願人 000000044

旭硝子株式会社

東京都千代田区有楽町一丁目12番1号

(72) 発明者 東田 英毅

神奈川県横浜市神奈川区羽沢町1150番地

旭硝子株式会社内

(72) 発明者 浜 祐子

神奈川県横浜市神奈川区羽沢町1150番地

旭硝子株式会社内

(74) 代理人 100098800

弁理士 長谷川 洋子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 シゾサッカロミセス・ポンペで使用可能なシグナルペプチド、分泌型発現ベクター、およびそれらを用いたタンパク質生産方法

(57) 【要約】

【目的】 異種タンパク質を細胞外に分泌させるシグナルペプチドをコードする遺伝子DNAを含み、分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンペ内で機能する新規な分泌型発現ベクターを得る。

【解決手段】 配列番号1のアミノ酸配列における1番目から22番目までのアミノ酸配列からなるシグナルペプチド、該ペプチドをコードする塩基配列からなるシグナル遺伝子。該遺伝子と連結した異種タンパク質構造遺伝子を含む分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンペ内で機能する発現ベクター。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 Met Phe Leu Lys Tyr Ile Leu Ala Ser Gly Ile Cys Leu Val Ser Leu Leu Ser Ser Thr Asn Ala のアミノ酸配列で表されるペプチド。

【請求項 2】 請求項 1 記載のペプチドをコードする DNA。

【請求項 3】 請求項 2 記載の DNA の配列を含む組換えベクター。

【請求項 4】 請求項 2 記載の DNA の配列とマルチクローニングサイトとを含むマルチクローニングベクター。 10

【請求項 5】 請求項 2 記載の DNA の配列と異種タンパク質構造遺伝子とを含む発現ベクター。

【請求項 6】 請求項 5 記載の発現ベクターを含む、分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) からなる形質転換体。

【請求項 7】 請求項 6 記載の形質転換体を培養し、発現された異種タンパク質を採取することを特徴とするタンパク質生産方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) で使用可能なシグナルペプチド、それをコードする DNA、その DNA の配列を含む組換えベクター (特に、マルチクローニングベクターおよび発現ベクター)、およびその発現ベクターを用いたタンパク質生産方法に関する。特に、分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベのショ糖分解酵素であるインベルターゼに由来するシグナルペプチドを用いることによって、目的タンパク質を効率よく酵母菌体外に分泌せしめるタンパク質生産方法に関する。 30

【0002】

【従来の技術】 遺伝子組換え技術を応用した異種タンパク質の生産は、様々な産業に用いられている。その宿主として主に大腸菌 (*Escherichia coli*)、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、メタノール酸化性酵母 (*Pichia pastoris*)、昆虫細胞、動物細胞が用いられている。あらゆる天然・人工のタンパク質を生産の対象とすることが想定され、しかも近年は精製タンパク質のみならず、それを用いた反応系を生産系とを共役させ、様々な化学物質の生産も試みられている。しかしながらあらゆるタンパク質あるいは化学物質を効率良く生産できる「全能性宿主 (ゼネラルホスト)」はいまだ開発されておらず、目的とするタンパク質あるいは化学物質ごとに生産系を構築するという試行錯誤が続いている。このため、個々の発現系においても、そのさらなる技術革新が待たれている。

【0003】 異種タンパク質、特に真核生物由来のタンパク質を生産するためには、微生物であり、かつ真核生物である酵母が最も良いと考えられている。酵母は、人 50

類史上長い間、特に食料品として人間の生活に密接に関与しているためなじみが深く、大量培養方法も確立しており、他の発現系に内在する人体に悪影響を及ぼす物質も含まない。これまでに種々の酵母を宿主とした発現系が開発されてきた (Romanos, M.A. et al., *Yeast* 8, 423-488, 1992)。中でも、分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) は出芽酵母サッカロミセス・セレビシエをはじめとする他の酵母に比べ様々な性質、例えば細胞周期や染色体の構造、RNA スプライシングなどが動物細胞により類似しているといわれ、生産されてくるタンパク質のアセチル化、リン酸化および糖鎖の付加などの翻訳後修飾も動物細胞でのそれに近いと考えられている (Russell, P.R. and Nurse, P., *Cell* 45, 781-782, 1986; Kaufer, N.F. et al., *Nature* 318, 78-80, 1985; Chappell, T.G. and Warren, G., *J. Cell. Biol.* 109, 2693-2702, 1989)。

【0004】 このため、動物細胞由来のタンパク質を発現させる宿主としては、分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベを用いた異種タンパク質生産法を用いることが有利であるのは明らかである。分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベを用いることによって、動物細胞の場合と同様の、より天然体に近い遺伝子産物が得られることが可能である。その培養に関しても微生物学の方法、特に酵母類で共通の方法を流用することができるなど、他の酵母で知られている知見を容易に応用できる。分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベについての組換え DNA 技術も、すでに実用段階に達している。これに対して、大腸菌などの原核生物を用いる方法では必ずしも全てのタンパク質について有効であるわけではなく、真核生物由来のタンパク質の複雑な翻訳後修飾あるいは天然体と同じ立体構造を再現することは必ずしも容易ではない。また大腸菌には特有のエンドトキシンが存在し、最終製品の夾雑物になる可能性がある。一方、動物細胞ないし昆虫細胞を用いる方法は、扱いが微生物より難しく、培養にコストがかかり、かつ生産効率も悪い。

【0005】 分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベを用いた遺伝子発現に関する研究は、大腸菌や出芽酵母に比べて遅れている (特開昭 61-181397 号公報、特開平 2-283288 号公報、特開平 4-63596 号公報等参照)。この原因は強力なプロモーターを持ち、菌体内に安定に存在し、かつ遺伝子を導入するのに最適かつ簡便な発現プラスミドの開発が遅れていたためである。最近になって、*nm t1+* 遺伝子のプロモータ領域を用いた誘導発現ベクター (pREP1) や動物細胞ウイルス由来のプロモーター領域をもつ、非常に発現能の高い分裂酵母用ベクターが開発されたため、ようやく分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベを用いての異種タンパク質の大量生産への道が開かれた (本発明者らの発明に係る特開平 5-15380 号公報、特開平 7-163373 号公報参照)。これらの技術を用いることによ

り、多くの細胞内タンパク質は容易に生産できるようになり、発現システムとしての有用性は高い。実際すでに、分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベは異種タンパク質遺伝子発現の宿主として次第に広く用いられるようになり、特にヒトを含む動物細胞由来の遺伝子の発現に適していることが知られている (Giga-Hama and Kumagai, eds., Foreign gene expression in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, Springer-Verlag, 1997)。またゴルジ体や小胞体を含む膜構造の発達が知られており、このことから膜タンパク質の発現にも用いられ、高い発現量を示している。

【0006】分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベは、真核生物でありながら遺伝学、分子生物学、細胞生物学分野での応用がきわめて容易な単細胞生物として広く研究されている (Nasim A. et al. eds., Molecular biology of the fission yeast, Academic Press, 1989)。その培養には炭素源としてブドウ糖 (グルコース) や果糖 (フルクトース) 等の単糖が主に用いられている。培地中にこれら単糖が存在しない場合、ショ糖 (スクロース) をブドウ糖と果糖に分解する酵素であるインベルターゼの発現が誘導され、生育に必要な炭素源を獲得することが知られておりインベルターゼタンパク質の精製について報告されている (Moreno S. et al., Arch. Microbiol. 142, 370, 1985)。

【0007】分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベにおいて、インベルターゼは細胞表層に存在しており、分子量 205,000 の高分子量糖タンパク質である。その 67% が糖鎖であり、等モルのマンノース残基とガラクトース残基から成り立っている。精製酵素のタンパク質分子量やアミノ酸組成および抗体を用いた実験から、分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベ由来のインベルターゼは出芽酵母サッカロミセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) のインベルターゼとタンパク質化学的にも非常に類似していることが知られている (Moreno S. et al., Biochem. J. 267, 697, 1990)。またグルコース濃度の低下によりインベルターゼの合成抑制が解除されることも知られている (Mitchison J. et al., Cell Sci 5, 373, 1969)。

【0008】出芽酵母サッカロミセス・セレビシエにおいても同様に、固有のインベルターゼの誘導生産現象 (脱抑制) が知られている。その発現における遺伝子レベルでの制御、生合成経路、糖鎖部分の構造解析等に関する研究はすでに詳細に行われている。すなわち、出芽酵母サッカロミセス・セレビシエのインベルターゼ遺伝子は染色体上に 6 個重複しており、SUC1~SUC5 および SUC7 という遺伝子によってコードされている。このうちの 1 つでも活性な SUC 遺伝子を持てばスクロースとラフィノースの資化性を示すことが知られている (Hohmann, S. and Zimmermann, F.K. Curr. Genet. 11, 217(1986))。

【0009】これに対し分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベでは、インベルターゼタンパク質の精製については報告されているが (Moreno S. et al., 1985)、その遺伝子に関しては本発明者らのグループの研究によって最近になってようやく明らかになった。すなわち、分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベのインベルターゼ遺伝子は染色体上に 2 個重複しており、*inv0* および *inv1* として同定されている。このうち *inv0* は ORF (オープンリーディングフレーム) が不完全で偽遺伝子であると推定された。よって唯一 *inv1* が分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベのインベルターゼをコードする遺伝子である。分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベはショ糖を唯一の炭素源として生育することが知られており (橋谷義孝編、「酵母学」、岩波書店、1967)、本インベルターゼによってショ糖の資化性を示すことが推定できる。

【0010】分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベは出芽酵母サッカロミセス・セレビシエとは進化系統的に全く異なる酵母である。すでに、染色体構造、ゲノム複製機構、RNA スプライシング機構、転写機構、翻訳後修飾等の諸機構が出芽酵母サッカロミセス・セレビシエに代表される他の酵母と大きく異なり、その一部は動物細胞と類似していることが知られている。このため真核生物のモデルとして広く用いられている (Giga-Hama and Kumagai eds., 1997)。このことは重大な意味を含む。すなわち、分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベにおいて分泌型発現ベクターを作製する場合、通常当該業者が行う方法である出芽酵母サッカロミセス・セレビシエ由来のシグナル配列の流用は、本分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベでは行うことができない。このため、長らくこのようなタイプのベクターの開発は遅れていた。

【0011】分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベ内で有効に機能するシグナル配列としては「Tokunaga, M. et al., Yeast 9, 379-387, 1993; Broker, M. et al., B. B. A. 908, 203-213, 1987」らの報告があるが、異種タンパク質を大量に生産するという本発明者らの目的としては不十分である。わずかに分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベ自身が細胞外に分泌するタンパク質の一つで、接合に関与する接合フェロモンである P-ファクターの前駆体 *Map2* が分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベ内の種々の酵素によってプロセッシングされて P-ファクターとなり培地中に分泌される事実 (Imai, Y. and Yamamoto, M., Gene & Dev. 8, 328-338; 特開平 6-327481 号公報参照)、および P-ファクター前駆体 *Map2* のシグナルを改変した P3 シグナルについての報告 (Giga-Hama and Kumagai eds., 1997) があるだけである。また *Toricoderma reesei* 由来のシグナル配列が機能するという例が報告されているが、異種タンパク質としての実施例は報告されていない。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、従来技術の前記問題点を解決すべくなされたものである。

【0013】本発明者らは新たに分裂酵母シゾサッカロミセス・ボンベのインペルターゼ遺伝子のクローニングを行い、分泌型発現ベクターを構築することによって本発明を完成させた。すなわち従来、分泌性の真核生物（宿主以外）由来タンパク質については、そのタンパク質が本来持つシグナル配列では酵母によって認識されにくい、生産物が宿主細胞から培地中に分泌されず、良い結果を得難かった。また精製の際には、その細胞を破壊した後不活性化しないように、種々の混在する細胞成分から目的のタンパク質を精製しなければならなかった。異種タンパク質を分泌生産させることは、これに比べて精製が容易であるという点で、望ましい方法であるばかりでなく、分泌生産されるタンパク質は宿主細胞の分泌経路に入るため、適当な処理、例えばジスルフィド結合の形成や糖鎖の形成がなされ、天然のタンパク質と同じあるいは非常に近い立体構造を形成できるという利点がある。

【0014】

【課題を解決するための手段】本発明は、分裂酵母シゾサッカロミセス・ボンベで使用可能なシグナルペプチド、それをコードするDNA、そのDNAの配列を含む組換えベクター（特に、マルチクローニングベクターおよび発現ベクター）、およびその発現ベクターを用いたタンパク質生産方法に関する、下記の発明である。

【0015】Met Phe Leu Lys Tyr Ile Leu Ala Ser Gly Ile Cys Leu Val Ser Leu Leu Ser Ser Thr Asn Alaのアミノ酸配列で表されるペプチド。

【0016】このペプチドをコードするDNA。

【0017】このDNAの配列を含む組換えベクター。

【0018】上記したDNAの配列とマルチクローニングサイトとを含むマルチクローニングベクター。

【0019】上記したDNAの配列と異種タンパク質構造遺伝子とを含む発現ベクター。

【0020】この発現ベクターを含む、分裂酵母シゾサッカロミセス・ボンベからなる形質転換体。

【0021】この形質転換体を培養し、発現された異種タンパク質を採取することを特徴とするタンパク質生産方法。

【0022】

【発明の実施の形態】本発明者らは上記分裂酵母シゾサッカロミセス・ボンベのインペルターゼの分泌性に着目し、そのシグナル配列ペプチドを用いた分泌型異種タンパク質生産系を提供することを目的とした。すなわちシグナル配列ペプチドをコードする遺伝子（シグナル遺伝子）配列を用いた分泌型発現ベクターを作製し、これを用いた異種タンパク質生産系を開発することを、以下に記載する手段によって検討した。

【0023】本発明を構成するため、まず、従来その遺

伝子レベルでの実体が不明であった分裂酵母シゾサッカロミセス・ボンベのインペルターゼ遺伝子の前駆体遺伝子を単離クローニングし、その塩基配列（配列表の配列番号1の塩基配列参照）ならびに構造を決定した。また、遺伝子破壊法によりインペルターゼ遺伝子がクローニングした、ただ一つの遺伝子ですべての活性を担っていること明らかにした。

【0024】具体的には、（1）分裂酵母シゾサッカロミセス・ボンベのcDNAライブラリーを鋳型テンプレートとして、他生物種起源のインペルターゼ遺伝子に良く保存されたアミノ酸配列から作製したプライマーを用いてPCR反応を行う、（2）得られたPCR産物をプローブとして分裂酵母シゾサッカロミセス・ボンベのゲノムライブラリーからブランクハイブリダイゼーション法によりポジティブクローンを選別する、（3）確認されたポジティブクローンからサザンハイブリダイゼーション法を用いて特定長のフラグメントを選別し、全塩基配列を決定する、（4）遺伝子破壊法を用いてインペルターゼ活性の有無を調べる、との手順によった。

【0025】得られた分裂酵母シゾサッカロミセス・ボンベのインペルターゼ遺伝子前駆体のどの領域がシグナル遺伝子として有効に機能しているかについては長い間不明であったが、さらなる検討の結果、本発明者らは前駆体タンパク質のアミノ末端側から22番目までのポリペプチド部分（配列表の配列番号1のアミノ酸配列参照）がシグナル配列として有効に機能している部分であることを見出した。本発明のシグナル配列をアミノ末端に持つ異種タンパク質はそれをコードする遺伝子を有する形質転換体内ではシグナル配列を有する異種タンパク質がまず産生され、引き続き菌体内でそのタンパク質がシグナルペプチダーゼの作用でシグナル配列部分が切断除去され、その後糖鎖付加などの修飾を受けた後、菌体外へ分泌される。目的とするタンパク質を培地から分離することにより、容易に目的タンパク質の回収を行うことができる。

【0026】分泌シグナルは配列表の配列番号1のアミノ酸配列の1～22番目までを必須として含み、それを超える長い配列であってもよい。その場合、シグナルペプチダーゼの作用で切断除去される場所より下流のポリペプチド部分が結合した異種タンパク質が分泌されることとなる。本来目的とする異種タンパク質にこの付加部分が結合した異種タンパク質が有用である場合、あるいは少なくとも不都合ではない場合（例えばその後に付加部分を除去しうる場合）、本発明の目的を達成することができる。しかし、通常付加部分が長い場合、目的とする異種タンパク質として不都合である場合が多い。したがって、付加部分はないかまたは短いものであることが好ましい。したがって、シグナル配列を含む配列番号1のアミノ酸配列の22番目までの配列を有する異種タンパク質が発現ベクターによって発現されるべく発現ベク

ターを構成することが好ましい。

【0027】本発明の分泌シグナル遺伝子は上記分裂酵母シゾサッカロミセス・ボンベ由来のシグナル配列をコードする遺伝子である。この分泌シグナル遺伝子は前記インペルターゼ前駆体遺伝子の上流部分に相当する。この遺伝子は分裂酵母シゾサッカロミセス・ボンベの染色体から採取することができ、また遺伝子合成することもできる。シグナル配列の遺伝子配列は上記分裂酵母シゾサッカロミセス・ボンベ由来の配列に限定されるものではなく、上記アミノ酸配列に対応する他の遺伝子配列であつてもよい。目的とする異種タンパク質はその構造遺伝子を組み込んだ発現系で発現される。発現系としては、異種タンパク質構造遺伝子を有する発現ベクターで形質転換した真核細胞が好ましい。真核細胞としては特に分裂酵母シゾサッカロミセス・ボンベが好ましい。発現系において異種タンパク質構造遺伝子の先端に上記した分泌シグナル遺伝子を結合することにより、分泌シグナルと異種タンパク質が結合したタンパク質が産生され、その後細胞内でプロセッシングされて、異種タンパク質が細胞外へ分泌される。

【0028】さらに本発明者らは、次に示す方法で、分裂酵母シゾサッカロミセス・ボンベの分泌型発現ベクターを作製し、具体例としてヒト・インターロイキン-6 a' c1 変異体 (特開平 7-224097 号公報参照) の分泌を確認した。すなわち、(1) 分裂酵母シゾサッカロミセス・ボンベ用発現ベクター pTL2M5 (特開平 5-15380 号公報参照) を改変して、インペルターゼシグナル遺伝子およびヒト・インターロイキン-6 a' c1 変異体構造遺伝子を導入した組換え分泌型発現ベクター pSL2I06 a' c1 を作製する、(2) 分泌型発現ベクター pSL2I06 a' c1 を用いて分裂酵母シゾサッカロミセス・ボンベを形質転換する、(3) ヒト・インターロイキン-6 a' c1 変異体の発現を SDS-PAGE・ウェスタンブロッティングを用いて確認する、との手順によった。

【0029】本発明の発現ベクターは前記シグナル遺伝子と異種タンパク質構造遺伝子が連結した遺伝子を有し、真核細胞宿主内においてその遺伝子の発現が可能である発現ベクターである。すなわち本発明の発現ベクターとしては、前記特開平 5-15380 号公報記載の構造を有する発現ベクターが好ましい。また、この発現ベクターに関連した前記特開平 7-163373 号公報記載のマルチクローニングベクターやそれを用いた発現ベクターの構築法を用いて本発明発現ベクターを構築することが好ましい。また発現ベクターは本発明におけるシグナル配列を用いて種々の方法で構築することができる。しかし、本発明の発現ベクターとしては上記公報記載の発現ベクター以外のものであつてもよく、例えば、上記発現ベクター pTL2M5 以外の発現ベクターにシグナル配列を導入して構築することができる。その発現

ベクターは染色体組み込み型のものであつてもよく、核外でコピー数を増やし安定に存在するものであつてもよい。以下、特開平 5-15380 号公報記載の構造を有する本発明発現ベクターについて説明するが、本発明発現ベクターはこれに限定されない。

【0030】異種タンパク質構造遺伝子に由来する異種タンパク質としては、特に限定されないが、高等動物由来の生理活性を持つタンパク質が望ましい。さらに例えば本来動物細胞にて分泌生産されているものであつて大腸菌では製造困難であるような糖タンパク質や、ジスルフィド結合が多く複雑な立体構造を持つタンパク質などが特に好ましい。例えばヒト血清アルブミンなどがある。

【0031】本発明の発現ベクターを構築するための一般的手法は公知であり、例えば文献「J.Sambrook et al., "Molecular Cloning 2nd ed.", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)」に記載されている方法で構築することができる。宿主として本発明で用いる分裂酵母シゾサッカロミセス・ボンベの菌株としては、例えば ATCC 38399 (leu1-32h) や ATCC 38436 (ura4-294h) 等が挙げられ、これらは、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (American Type Culture Collection) から入手できる。発現ベクターを用いてシゾサッカロミセス・ボンベを形質転換する方法は公知であり、例えば酢酸リチウム法 (K.Okazaki et al., Nucleic Acids Res., 18, 6485-6489 (1990)) 等によって形質転換体を得られる。形質転換体の培養方法もまた公知であり、例えば「M.D. Rose et al., "Methods In Yeast Genetics", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1990)」に記載されている。培養物中に生産されたタンパク質の回収方法としては、まず濾過あるいは遠心分離ないし膜分離操作によって酵母菌体を除いた後、硫酸沈殿やトリクロロ酢酸沈殿のように溶解度の差を利用する方法あるいは透析・限外濾過またはゲル電気泳動法等の分子量の差を利用する方法、イオン交換クロマトグラフィー等の荷電の差を利用する方法、アフィニティークロマトグラフィー等の特異的親和性を利用する方法、逆相高速液体クロマトグラフィー等の疎水性の差を利用する方法、等電点電気泳動法等の等電点の差を利用する方法など、公知の技術を用いることによって可能である。必要に応じて更なる精製を行つても良い。

【0032】

【実施例】次に本発明を実施例をもって具体的に説明するが、実施例は具体的認識を得るために挙げたものであり、本発明を限定するものではない。なお、参考例で利用したインペルターゼ遺伝子の単離と同定を示す。

【0033】[参考例：インペルターゼ遺伝子の単離と同定] 分裂酵母シゾサッカロミセス・ボンベの cDNA ライブラリーをテンプレートとして、他生物種起源のイ

ンペルターゼ遺伝子間でよく保存された配列部分をもとに設計したプライマーを用いて、PCRによる増幅を行った。その結果、300bpおよび400bpの近傍に増幅されたバンドが得られた。それぞれのPCR産物をEASY TRAP (宝酒造 (株) 製) を用いて精製した。pMOSBlueTベクターキット (アマシャムファルマシアバイオテック社製) を用いて得られたPCR産物をベクターに組み込み、塩基配列の決定を行った。その結果、400bpのPCR産物をアミノ酸に変換した部分アミノ酸配列が出芽酵母サッカロミセス・セレビシエのSUC2遺伝子と高い相同性を示した。

【0034】この400bpのPCR産物をプローブとして分裂酵母シゾサッカロミセス・ボンベのゲノムDNAライブラリーからブラックハイブリダイゼーション法により全インペルターゼ遺伝子を含むポジティブクローンの取得を試みた。その結果、約8000のブラックから15個のポジティブクローンが取得された。このポジティブクローンの2次スクリーニングを行うため、再びブラックハイブリダイゼーションを行った。その結果、感光したブラックが4個得られた。ポジティブクローンのファージDNAを少量抽出し、種々の制限酵素で処理して切断パターンを比較したところすべて同一であった。よって、取得されたポジティブクローンは1種類であることがわかった。

【0035】インペルターゼ遺伝子の全長は、次の二段階の方法で取得した。ハイブリッドを形成した3.0kbのHindIII消化フラグメントを単離し、プラスミドpBluescript IISK- (東洋紡 (株) 製) に組み込んだ。制限酵素地図を作成したところ、BamHIおよびSalIの制限酵素部位が確認された。そこでこれらの制限酵素を用いてサブクローニングを行い、加えてディレーションを併用して塩基配列の決定を行った。その結果、HindIIIフラグメントに遺伝子のORFを全て含むことがわかった。しかし遺伝子発現に関与すると思われる上流領域は約200bpしか含まなかった。そのため新たに、ハイブリッドを形成した3.5kbのBamHI消化フラグメントをさらにHindIII消化によって2.6kbのフラグメントとして単離し、プラスミドpBluescript IISK-に組み込み、同様にサブクローニングとディレーションにより塩基配列を決定した。その結果、BamHI-HindIIIフラグメントには遺伝子発現に関与する上流配列と思われる領域が含まれていることがわかった。得られた全長5.6kbの遺伝子をinv1'遺伝子と名付けた。その塩基配列およびORFのアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。また、この遺伝子全長を組み込んだプラスミドをpINV3000と名付けた。この結果、inv1'遺伝子にはN結合型糖鎖付加部位は16箇所存在していることがわかった。加えて、アミノ酸配列から推定されるシグナルペプチド開

裂部位は22残基目と23残基目のアミノ酸の間に存在していると考えられた。また、分裂酵母シゾサッカロミセス・ボンベのinv1'遺伝子配列から推定されるアミノ酸配列、シュワニオミセス・オシデンタリス (Schwannomyces occidentalis) のインペルターゼのアミノ酸配列、出芽酵母サッカロミセス・セレビシエのSUC2遺伝子配列から推定されるアミノ酸配列を比較したところ、inv1'遺伝子配列から推定されるアミノ酸配列は、他生物種起源のインペルターゼであるシュワニオミセス・オシデンタリス由来のものおよび出芽酵母サッカロミセス・セレビシエ由来のものと高い相同性を示すことがわかった。このことから、本遺伝子はインペルターゼをコードするものであると推定された。

【0036】プラスミドpBluescript IISK-の制限酵素ClaI認識部位にシゾサッカロミセス・ボンベ由来ura4'遺伝子を組み込んだプラスミドを制限酵素HindIIIで消化し、末端平滑化の後セルフライゲーション (自己環状化) させてHindIIIサイトを破壊した。このプラスミドを制限酵素XbaIおよびHincIIで二重消化してura4'フラグメントを取得した。次にプラスミドpBluescript IISK-を制限酵素SpeIで消化して末端平滑化し、さらに制限酵素XbaIで消化したベクターに上述のura4'フラグメントを組み込み、制限酵素BamHI認識部位をura4'の両側に配置したプラスミドを作製した。プラスミドpBluescript IISK-の制限酵素BamHI認識部位も上述のように制限酵素処理、末端平滑化、セルフライゲーションにより破壊し、HindIII部位にinv1'遺伝子のORF領域を含む3.0kbのフラグメントを組み込んだ。このプラスミドをBamHIで消化して挿入フラグメント中の1.4kbのフラグメント (inv1'のORFのC末端側領域を含む) を除き、両側にBamHIサイトを持つura4'遺伝子を組み込んだ。このプラスミドをHindIIIで消化して両端にinv1'遺伝子の近傍の領域を含むDNAフラグメントを取得した。

【0037】このフラグメントで分裂酵母シゾサッカロミセス・ボンベの野生株TP4-1D [h⁺, leu⁺, ura4⁻, ade6-M216, his2⁻, 登田隆博士 (Imperial Cancer Research Foundation) より供与] を形質転換してウラシル無添加の培地に生育してきたコロニーを得た。オーバーレイアッセイによりインペルターゼ活性について検討したところ、活性の消失した株は28株中7株存在していた。すなわち得られたura4'コロニーの中でインペルターゼ活性の消失した株は25%であった。

【0038】さらに染色体上のinv1'遺伝子の破壊をサザンハイブリダイゼーションによって確認した。インペルターゼ活性の消失した株からゲノムDNAを抽出

し、制限酵素HindIIIおよびSalIによって二重消化し、inv1'遺伝子のHindIII-SalI消化フラグメント(2.0kb)をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、インペルターゼ活性の消失した株の染色体DNA上のinv1'遺伝子がura4'遺伝子に置換されていることを確認した。

【0039】分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベ用発現ベクターpAU-SK〔下田親博士(大阪市立大学理学部)より供与〕に、インペルターゼ遺伝子inv1'を制限酵素HindIIIで処理したORF全長を含む3.0kbの切断フラグメントを組み込み、得られた組換えベクターを用いて上記インペルターゼ欠損株を形質転換した。得られた形質転換体をYPスクロース培地

(10μg/mlのアンチマイシンAおよび20μg/mlのプロムクレゾールパープル添加)にストリークして、インペルターゼ活性の有無をオーバーレイアッセイによって調べた。加えてインペルターゼ遺伝子inv1'の上流プロモータ領域を含む2.6kbのBamHI-HindIII切断フラグメントをインペルターゼ遺伝子のORFを含む2.0kbのHindIII-SalI切断フラグメントと連結させた4.6kbのBamHI-SalI切断フラグメントをpAU-SKに組み込み、得られた組換えベクターを用いてインペルターゼ欠損株を形質転換し、同様にインペルターゼ活性の有無をオーバーレイアッセイによって調べた。

【0040】その結果、いずれの形質転換株においても、また野生株TP4-1Dにおいても、遺伝子破壊株にはみられない青い染色が観察され、インペルターゼを発現していることが確認された。さらに上流プロモータ領域を付加した場合、染色度がより強く、高いレベルでインペルターゼを発現していることが示唆された。また、YPスクロース培地(10マイクログラム/ミリリットルのアンチマイシン含有)における生育を調べた結果、インペルターゼ欠損株はほとんど生育を示さなかったが、野生株と形質転換株は30℃、5日間の培養での生育を確認した。

【0041】以上の結果よりinv1'遺伝子がインペルターゼを発現して細胞表層にインペルターゼを生産していることが証明された。

【0042】〔実施例1〕

インペルターゼ遺伝子発現ベクターpTL2INV1の作製

分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベのインペルターゼ遺伝子を含むプラスミドpINV3000(参考例参照)をテンプレートとして、配列番号2および配列番号3に示すオリゴDNAをプライマーとしたPCR法によってインペルターゼ遺伝子のORF領域を含む配列を増幅し、かつ、両末端に制限酵素認識配列を導入した。制限酵素AflIII(ニューイングランドバイオラボ)

およびHindIII(宝酒造(株)製)による二重消化で末端を処理し、アガロースゲル電気泳動によって、約3000塩基対に相当するバンドを切出し、EASY TRAP(宝酒造(株)製)を用いたガラスビーズ法で精製し、挿入フラグメントとした。

【0043】分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベ用マルチクローニングベクターpTL2M(特開平7-163373号公報参照)を、制限酵素SpeIおよびEcoIによる二重消化で末端を処理し、アガロースゲル電気泳動によって、約4500塩基対に相当するバンドを切出し、EASY TRAPを用いたガラスビーズ法で精製し、ベクターフラグメントとした。

【0044】これら2本のフラグメントを、DNAライゲーションキット(宝酒造(株)製)を用いて連結した。大腸菌DH5株(東洋紡(株)製)を形質転換した後、制限酵素地図の作製および塩基配列決定によって、インペルターゼ遺伝子発現ベクターpTL2INV1を保持する大腸菌をスクリーニングし、この発現ベクターをアルカリ-SDS法によって大量調製した。

【0045】〔実施例2〕

インペルターゼシグナル配列遺伝子を用いたIL-6a'c1分泌型発現ベクターpSL2I06a'c1の作製

分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベのインペルターゼ遺伝子を含むプラスミドpINV3000(参考例参照)をテンプレートとして、配列番号4および配列番号5に示すオリゴDNAをプライマーとしたPCR法によってインペルターゼシグナルを含む配列を増幅し、かつ、両末端に制限酵素認識配列を導入した。制限酵素SpeI(宝酒造(株)製)およびEcoRI(宝酒造(株)製)による二重消化で末端を処理し、アガロースゲル電気泳動によって、約700塩基対に相当するバンドを切出し、EASY TRAP(宝酒造(株)製)を用いたガラスビーズ法で精製し、挿入シグナルフラグメントとした。

【0046】ヒト・インターロイキン-6a'c1改変体のcDNAを含むプラスミドpSL2P06a'c1(WO96/23890号明細書参照)をテンプレートとして、配列番号6および配列番号7に示すオリゴDNAをプライマーとしたPCR法によって、インターロイキン-6a'c1改変体のORFを含む領域を増幅した。制限酵素EcoRIおよびHindIII(宝酒造(株)製)による二重消化で末端を処理し、アガロースゲル電気泳動によって、約600塩基対に相当するバンドを切出し、EASY TRAP(宝酒造(株)製)を用いたガラスビーズ法で精製し、挿入遺伝子フラグメントとした。

【0047】分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベ用マルチクローニングベクターpTL2M(特開平7-163373号公報参照)を、制限酵素SpeIおよびHi

10

20

30

40

50

nd IIIによる二重消化で末端を処理し、アガロースゲル電気泳動によって、約4500塩基対に相当するバンドを切出し、EASY TRAPを用いたガラスビーズ法で精製し、ベクターフラグメントとした。

【0048】これら3本のフラグメントを、DNAライゲーションキットを用いて連結した。大腸菌DH5株（東洋紡（株）製）を形質転換した後、制限酵素地図の作製および塩基配列決定によって、IL-6a' c1分泌型発現ベクターpSL2106a' c1を保持する大腸菌をスクリーニングし、この発現ベクターをアルカリ-SDS法によって大量調製した。

【0049】【実施例3】

分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベ形質転換体ASP168株の作製

インターロイキン-6a' c1改変体分泌型発現ベクターpSL2106a' c1（実施例2記載）および導入ベクターpAL7を用いて、分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベのロイシン要求性株ARC001（leu1-32h⁻（ATCC38399と同等））を岡崎ら（Okazaki et al., "Nucleic Acid Research", 18, 6485-6489, (1990)）に記載の方法に従って形質転換した。

【0050】YES液体培地で前培養済みのARC001培養液1mlを100mlの最少培地MB+Leuに接種し、30℃で16時間振盪培養した。集菌、洗菌後、0.1M酢酸リチウム（pH5.0）に細胞濃度が10⁸個/mlになるように懸濁し、30℃で60分間インキュベートした。上記懸濁液100μlに、2μgの組換えベクターpSL2106a' c1および1μgのPst I消化したpAL7をTE15μlに溶かして加え、さらに50%PEG4000を290μl加えてよく混合した後、30℃で60分間、43℃で15分間、室温で10分間の順にインキュベートした。PEGを遠心除去した後、菌体を1mlの1/2YEL+Leu培地に懸濁した。10倍に希釈したもの1mlを32℃で1時間インキュベートし、うち300μlを最少寒天培地MMAにスプレッドした。32℃で3日間培養したところ、約1000個の互いに独立したコロニーがプレート上に出現した。

【0051】得られた形質転換体（コロニー）を、抗生物質G418を10μg/mlの濃度で含有する2mlのYEL培地（YEL10培地）に接種し、32℃で5日間振盪培養した。生育したクローンを目的の形質転換体の候補として、グリセロール凍結保存するとともに、ASP168株と名付け、以下の実験に使用した。

SEQUENCE LISTING

<110> Asahi Glass Co., Ltd.

<120> Signal peptides and secretory expression vectors usable in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, as well as the production of proteins using the same

* 【0052】【実施例4】

培地中に分泌されたインターロイキン-6a' c1改変体の発現解析

分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベ形質転換体ASP168株（実施例3）を500μg/mlのG418を含むMAカザミノ酸培地（2%カザミノ酸、3%グルコースを含むMA培地、MA培地の組成は「Alfa et al., "Experiments with Fission Yeast", Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1993)」に記載）に接種し、32℃で2日間培養した。

【0053】培養後遠心して培養上清を集めた後、メンブレンフィルター（アミコン製）を用いて100倍に濃縮した。濃縮したサンプルをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を使用し、クマシーブリリアントブルーで染色して解析した。その結果であるSDS-PAGE観察図を図1に示す。図1におけるレーン1は精製インターロイキン-6a' c1改変体を、レーン2はASP168株の培養上清を、レーン3は対照であるASP021株（ORFを持たないベクターによる形質転換体。pTL2M（特開平7-163373号公報参照）をもとに特開平7-163373号公報記載の方法にしたがって作成した発現対象遺伝子をもたないベクターのみの組換え体）の培養上清を示す。レーン3に示されている分子量約20000のバンドがインターロイキン-6a' c1改変体であることが、レーン1およびレーン3との比較から推定される。

【0054】さらに上記培養上清を抗IL-6a' c1抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析した結果の観察図を図2に示す。図2におけるレーン1は精製インターロイキン-6a' c1改変体を、レーン2はASP168株の培養上清を、レーン3は対照であるASP021株（ORFを持たないベクターによる形質転換体）の培養上清を示す。レーン2に示されている分子量約20000のバンドがインターロイキン-6a' c1改変体であることが、レーン1およびレーン3との比較から確認された。

【0055】

【発明の効果】分裂酵母シゾサッカロミセス・ポンベ内で機能する新規な分泌型発現ベクターを構築することができ、さらにその発現ベクターを用いて異種タンパク質を効率良く分泌生産させることに成功した。

【0056】

【配列表】

<130> 980617

<160> 7

<170> PatentIn Ver. 2.0

[0057]

<210> 1

<211> 4748

<212> DNA

<213> Schizosaccharomyces pombe

<400> 1

```

ggatcctagt ccgcgaaatc gagatgcttt gaagattaaa attaaattta attttatgcg      60
agacttggtt cttattttt tgtatagtcg catgcaagcg aggttcgcat aatttgga    120
ataaaggtag tcaagaagac gttgaattaa ggctgcagtt tcaaagtact ctacaaacga    180
ttccttttaa aaaaaaagat tcaaaaaaaa ggcaaagggt ttaagtaatg cttgttattt    240
caatttacct ccaaacagtt actaatgcaa ttgcaaaaaa aaaacctacc tattgaatca    300
aaatttctag cccatccatc gctcctcaag ataaaggaat cgatattttg agtttaaggg    360
agttgctgat agatttcaga attaaaaatt tttggaaaag gatgtcgaga acaagaagat    420
acgtctagat tgctgatgat gcattctagc agacggaaat acaacgatat gtggacagca    480
cgacttttga tccgttcgga tcaaaaggaa gagaatatc catctttcaa gaagaatgca    540
ggaaaagcaa taaatgcccc ttgatctcct aaattatccc caaaaatgaa cattatgaga    600
tcttcttggt ggagacagga aatttcgcaa ttccaaacga aaattcggct ctttttttta    660
ccccacagtt gcggggtaaa tgatgtaacg gaccttgggg gaaaggatga tgagttagtt    720
gggaagcgga aaaaatggaa aacggaagta agaatagaaa ccagtatggc tgagtgaat    780
ggcggaaaag attttacaga gatgacaaga atctatttat ctataaggaa aaactttttc    840
caaatttgtc taaaaacgca ttctcctcaa ttgcctctag gtagatgata taacgaattg    900
gaacgagaca tcgctaaccg gttttctttg taaatgacat ttgtagtgg gagtaagttt    960
gaatggaggg atagacagat gaatagtatg agatagaaga atagtatata taatgattaa   1020
gatgaacaaa taaaaattga aagaaaaaag aaattgttgg ctcatattgt tcatacacat   1080
gttggttcat acaactttta cccatcgtaa gtattataag taaaaaatag agtacgaaaa   1140
gctataagta gtgaagcaaa aaaatagaaa aatagaaaaa aaaatatata taaaaaata   1200
taataaaaat aaaactcata agagacgtaa aacacaagaa ttgtctatca ttgttcttt   1260
aagaagcacc accattctgt aaaactcttc atttctcatt agcaaggacc cttttcattc   1320
cttctctttt agaatccttt tcattataac gaattggata atacgcaaat aagaacacat   1380
cccctaaata cgatatatcg atccattttt tactttgcct agcttattgc tgtacaattc   1440
catttaaata gtttctcctc aagaaagatc gtcaatggag gcgacaatat accggaattt   1500
aagttgcgga cacagagctt gaaaagactg cattttgtat tgttttcaag taaatgaaac   1560
tgagttttga agtctcaaaa tacatcttat gtattgaaca ttagaagaac atataagata   1620
gatcttgaga gctcaattca tcgacattct agccatcata ctgcgatctt agacattgtc   1680
agcacaacct tagatcgaaa atgaacacgt taccaaacgt tgtctaaaaa ttgccgaatc   1740
ttatctccgc attacttccg taatccttag tacatacgct gcaatttcgg aaggtcatga   1800
tcgacttttt gtgtagctat aagtgcgca aatgagaaac atgacaaggt gcgatattta   1860
gcaagatatt atgcatttga tggagaaagg aaatttcgga tgtatatata gtaccgttag   1920
ctgcgctttt tttggtcatc cataattttc aaactcactg ctttcgatca gatttaccgt   1980
ttttaaggtc tttattgctt tgtgatctgt aggttgaac atctatagtt cattttctaa   2040
aagatccttt catcgtttca tcggatagta atcgttcaag aaaaaaaaag aaaaaaagaa   2100
aaagaaaaag aaaaagaaaa taaaccgcta taattcatta cctatttgac tgaagttct   2160
tcatcttgaa ttgttttgaa tcaaaataaa gaaattatta ttattatttt ttttcttcgc   2220
ttttctttta tccattcgtc gaaactattt ttctgctgat aaaagcaatc attccttttt   2280
cctgtttctc ttgttattcg aattttaaac gacttttttt cctcgtccat tccctaattc   2340
tttgcgacct tttctgattc tatccttggt ttgtactttc gttgtgtaat tgttgagaaa   2400
gtgaactgat tatttaattg ttgtgaaaaa aattctaaaa ctattttgtt tttcttgatc   2460

```

17	18
attcatcctt tgctcgcttg ctggaatatt acagaaattc gtctcccttt caacggaata	2520
tgataatttg ttgaatactc taaatcaatt aacacctatc aaaagctgaa acattaaatc	2580
tattctcacc aaaaaaaaaag actcaagctt ctctgttggt ggccgggtctc ttttttggtt	2640
tacgattggt aaattttata ctcaactg ccaattctcc acttttgact atttattgat	2700
agtccttatt taattttctg ttcaccgatt atcgctcttt ttgtaataaa tctttcttgg	2760
aaccaaccaa ttaatacgtt ataatcgcta actttgaaga ttgctaca atg ttt ttg	2818
	Met Phe Leu
	1
aaa tat att tta gct agt ggc att tgc ctc gtc tct ctc tta tca tct	2866
Lys Tyr Ile Leu Ala Ser Gly Ile Cys Leu Val Ser Leu Leu Ser Ser	
5 10 15	
aca aac gcg gct ccc cgt cac tta tat gta aaa cgt tat cct gtc att	2914
Thr Asn Ala Ala Pro Arg His Leu Tyr Val Lys Arg Tyr Pro Val Ile	
20 25 30 35	
tat aat gct tcc aac atc act gaa gtc agc aat tct acc acc gtt cct	2962
Tyr Asn Ala Ser Asn Ile Thr Glu Val Ser Asn Ser Thr Thr Val Pro	
40 45 50	
cct cct cca ttc gta aat aca acg gcc cct aat ggg act tgt ttg ggt	3010
Pro Pro Pro Phe Val Asn Thr Thr Ala Pro Asn Gly Thr Cys Leu Gly	
55 60 65	
aac tat aac gag tat ctt cct tca gga tat tac aat gct acc gat cgt	3058
Asn Tyr Asn Glu Tyr Leu Pro Ser Gly Tyr Tyr Asn Ala Thr Asp Arg	
70 75 80	
ccc aaa att cat ttt act cct tct tcc ggt ttc atg aat gat cca aac	3106
Pro Lys Ile His Phe Thr Pro Ser Ser Gly Phe Met Asn Asp Pro Asn	
85 90 95	
gga ttg gta tat act ggc ggc gtc tat cac atg ttc ttc caa tat tca	3154
Gly Leu Val Tyr Thr Gly Gly Val Tyr His Met Phe Phe Gln Tyr Ser	
100 105 110 115	
cca aaa act cta aca gcc ggc gaa gtt cat tgg ggt cac aca gtt tcc	3202
Pro Lys Thr Leu Thr Ala Gly Glu Val His Trp Gly His Thr Val Ser	
120 125 130	
aag gat tta atc cat tgg gag aat tat cct att gcc atc tac ccc gat	3250
Lys Asp Leu Ile His Trp Glu Asn Tyr Pro Ile Ala Ile Tyr Pro Asp	
135 140 145	
gaa cat gaa aac gga gtt ttg tcc ctc cca ttt agt ggc agt gca gtc	3298
Glu His Glu Asn Gly Val Leu Ser Leu Pro Phe Ser Gly Ser Ala Val	
150 155 160	
gtc gat gtt cat aat tct tcc ggt ctc ttt tcc aac gac acc att ccg	3346
Val Asp Val His Asn Ser Ser Gly Leu Phe Ser Asn Asp Thr Ile Pro	
165 170 175	
gaa gag cgc att gtt tta att tat acc gat cat tgg act ggt gtt gct	3394
Glu Glu Arg Ile Val Leu Ile Tyr Thr Asp His Trp Thr Gly Val Ala	
180 185 190 195	
gag cgt cag gct att gcg tat acc act gat ggt gga tat act ttc aaa	3442
Glu Arg Gln Ala Ile Ala Tyr Thr Thr Asp Gly Gly Tyr Thr Phe Lys	
200 205 210	
aaa tat tca gga aat ccc gtt ctt gac att aat tca ctt caa ttc cgc	3490
Lys Tyr Ser Gly Asn Pro Val Leu Asp Ile Asn Ser Leu Gln Phe Arg	
215 220 225	

19	20	
gac ccc aag gta ata tgg gat ttc gat gct aat cgt tgg gtg atg att		3538
Asp Pro Lys Val Ile Trp Asp Phe Asp Ala Asn Arg Trp Val Met Ile		
230	235	240
gta gct atg tct caa aat tat gga att gcc ttt tat tcc tcc tat gac		3586
Val Ala Met Ser Gln Asn Tyr Gly Ile Ala Phe Tyr Ser Ser Tyr Asp		
245	250	255
ttg att cac tgg acc gag tta tct gtt ttc tcc act tct ggt tat ttg		3634
Leu Ile His Trp Thr Glu Leu Ser Val Phe Ser Thr Ser Gly Tyr Leu		
260	265	270
ggg ttg caa tat gaa tgc cct gga atg gct cgt gtg ccc gtt gaa ggc		3682
Gly Leu Gln Tyr Glu Cys Pro Gly Met Ala Arg Val Pro Val Glu Gly		
280	285	290
acc gat gaa tac aaa tgg gta ctc ttc at ctc catc aat cct ggc gct		3730
Thr Asp Glu Tyr Lys Trp Val Leu Phe Ile Ser Ile Asn Pro Gly Ala		
295	300	305
cca ttg gga gga tcc gtt gtc caa tac ttt gtt ggc gat tgg aat ggt		3778
Pro Leu Gly Gly Ser Val Val Gln Tyr Phe Val Gly Asp Trp Asn Gly		
310	315	320
aca aac ttc gtc ccc gat gat ggc caa act aga ttc gta gac ttg ggt		3826
Thr Asn Phe Val Pro Asp Asp Gly Gln Thr Arg Phe Val Asp Leu Gly		
325	330	335
aag gac ttt tac gcc agc gct ttg tat cac tcg tct tcc gcc aat gcc		3874
Lys Asp Phe Tyr Ala Ser Ala Leu Tyr His Ser Ser Ser Ala Asn Ala		
340	345	350
gat gtt att gga gtt gga tgg gct agc aac tgg caa tac acc aac caa		3922
Asp Val Ile Gly Val Gly Trp Ala Ser Asn Trp Gln Tyr Thr Asn Gln		
360	365	370
gct cct act caa gtt ttc cgc agt gct atg aca gtt gca cga aaa ttc		3970
Ala Pro Thr Gln Val Phe Arg Ser Ala Met Thr Val Ala Arg Lys Phe		
375	380	385
act ctt cgc gac gtt cct cag aac ccc atg acc aac ctt act tct ctc		4018
Thr Leu Arg Asp Val Pro Gln Asn Pro Met Thr Asn Leu Thr Ser Leu		
390	395	400
att caa acc cca ttg aat gtt tct ctc tta cga gat gaa aca cta ttt		4066
Ile Gln Thr Pro Leu Asn Val Ser Leu Leu Arg Asp Glu Thr Leu Phe		
405	410	415
acc gca ccc gtt atc aat agt tca agt agt ctt tcg ggc tct ccg att		4114
Thr Ala Pro Val Ile Asn Ser Ser Ser Ser Leu Ser Gly Ser Pro Ile		
420	425	430
act ctt cca agc aat acc gca ttc gag ttc aat gtc aca ctc agt atc		4162
Thr Leu Pro Ser Asn Thr Ala Phe Glu Phe Asn Val Thr Leu Ser Ile		
440	445	450
aat tac aca gaa ggc tgc aca aca gga tat tgt ctg ggg cgt att atc		4210
Asn Tyr Thr Glu Gly Cys Thr Thr Gly Tyr Cys Leu Gly Arg Ile Ile		
455	460	465
att gat tct gat gat cca tac aga tta caa tcc atc tcc gtg gac gtt		4258
Ile Asp Ser Asp Asp Pro Tyr Arg Leu Gln Ser Ile Ser Val Asp Val		
470	475	480
gat ttt gca gct agc act tta gtc att aat cgt gcc aaa gct cag atg		4306
Asp Phe Ala Ala Ser Thr Leu Val Ile Asn Arg Ala Lys Ala Gln Met		

	21		22
	485	490	495
	gga tgg ttt aat tca ctt ttc acg cct tct ttt gcc aac gat att tac		4354
	Gly Trp Phe Asn Ser Leu Phe Thr Pro Ser Phe Ala Asn Asp Ile Tyr		
	500	505	510
	att tat gga aac gta act ttg tat ggt att gtt gac aat gga ttg ctt		4402
	Ile Tyr Gly Asn Val Thr Leu Tyr Gly Ile Val Asp Asn Gly Leu Leu		
	520	525	530
	gaa ctg tat gtc aat aat ggc gaa aaa act tac act aat gac ttt ttc		4450
	Glu Leu Tyr Val Asn Asn Gly Glu Lys Thr Tyr Thr Asn Asp Phe Phe		
	535	540	545
	ttc ctt caa gga gca aca cct gga cag atc agc ttc gct gct ttc caa		4498
	Phe Leu Gln Gly Ala Thr Pro Gly Gln Ile Ser Phe Ala Ala Phe Gln		
	550	555	560
	ggc gtt tct ttc aat aat gtt acc gtt acg cca tta aag act atc tgg		4546
	Gly Val Ser Phe Asn Asn Val Thr Val Thr Pro Leu Lys Thr Ile Trp		
	565	570	575
	aat tgc taaatat ttt gttcaagtt aggaaagtat aataactttt gtcctgcat		4602
	Asn Cys		
	580		
	attcaattgt aaagtttagt ttatcctttc atcgtaacca caattgtcac ctaaatctct		4662
	aaaaatctct tcacttatct agttaatgtc gtaacaaaaa agtccagtag cticgggaaa		4722
	tgatgcttgg aatcatacaa gtcgac		4748
【0058】			
	<210> 2		
	<211> 28		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
	<400> 2		
	gggac atggt tttga aatat atttt agc		28
【0059】			
	<210> 3		
	<211> 27		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
	<400> 3		
	gggaa gctta gcaat tccag atagt ct		27
【0060】			
	<210> 4		
	<211> 20		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
	<400> 4		
	ttgac tagtt attaa tagta		20
【0061】			
	<210> 5		
	<211> 29		
	<212> DNA		
	<213> Artificial Sequence		
	<400> 5		
	cccga attca taacg tttta catat aagt		29

【0062】

<210> 6
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 6
 aaaga attcc cagta ccccc aacct ctcca

29

【0063】

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <400> 7
 aaaat gattt aaagg ctata

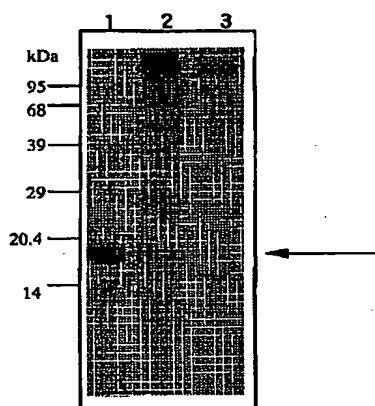
20

【図面の簡単な説明】

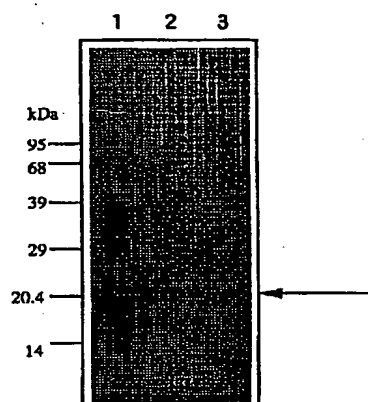
【図1】実施例4におけるSDS-PAGE観察図（電気泳動図）である。

* 【図2】実施例4におけるウエスタンブロット観察図（電気泳動図）である。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.

識別記号

F I

テーマコード(参考)

C 1 2 R 1:645)

(C 1 2 P 21/02

C 1 2 R 1:645)

F ターム(参考) 4B024 AA20 BA26 CA04 DA12 EA04

FA18 GA11 GA19 HA01

4B064 AG03 CA06 CA19 CC24 CE14

DA20

4B065 AA72X AA72Y AA93Y AB01

BA02 CA24 CA60

4H045 AA10 AA20 BA17 CA15 DA02

FA72 FA74 GA31

